

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08040925 A**

(43) Date of publication of application: **13.02.96**

(51) Int. Cl.

**A61K 38/00**

**A61K 9/06**

**A61K 9/08**

**// A61K 38/16**

(21) Application number: **06181212**

(22) Date of filing: **02.08.94**

(71) Applicant: **SENJU PHARMACEUT CO  
LTD MORINAGA MILK IND CO LTD**

(72) Inventor: **SOGAWA SHUNJI  
MATSUMOTO TAKAHIRO  
YOKOGAKI SHIYUICHI**

(54) **AGENT FOR TREATING CORNEA INJURY**

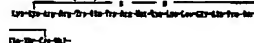
ointment.

(57) Abstract:

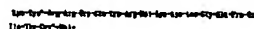
**PURPOSE:** To obtain the cornea injury-treating agent capable of significantly inhibiting the progression of the eye lesion of Sjogren's syndrome, especially drying keratoconjunctivitis, and capable of treating the disease.

**CONSTITUTION:** The cornea injury-treating agent contains a peptide originated from the hydrolysate of lactoferrin, its derivative, its salt or their mixture as an active ingredient. The peptide originated from the hydrolysate of the lactoferrin includes peptides represented by formulas I-IV (Cys\* is cysteine whose thiol group is chemically modified for inhibiting the formation of a disulfide bond) and comprising at least 20, usually 20-47, preferably 25-38 amino acid residues, and is preferably a peptide of formula V isolated from the hydrolysate of bovine lactoferrin, peptides of formulas VI and VII isolated from the hydrolysate of human lactoferrin, especially a peptide of formula VI. The therapeutic agent is preferably prepared in the preparation form of an ophthalmic solution or an ophthalmic ointment, and the content of the peptide is preferably 0.0001-1W/V% in the case of the ophthalmic solution and 0.0001-1W/W% in the case of the ophthalmic

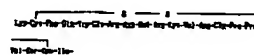
**COPYRIGHT: (C)1996 JPO**



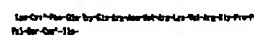
I



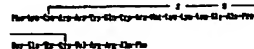
II



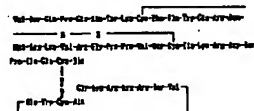
III



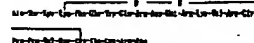
IV



V



VI



VII

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-40925

(43) 公開日 平成8年(1996)2月13日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ABL			
9/06	V			
9/08	V			
			A 6 1 K 37/ 18	ABL
			37/ 14	
			審査請求 未請求 請求項の数 8	OL (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-181212	(71) 出願人	000199175 千寿製薬株式会社 大阪府大阪市中央区平野町2丁目5番8号
(22) 出願日	平成6年(1994)8月2日	(71) 出願人	000006127 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号
		(72) 発明者	十川 俊二 大阪府八尾市八尾木北3丁目85番地
		(72) 発明者	松本 隆弘 兵庫県明石市魚住町鴨池2番地の5コスモ ハイツ西海301号
		(74) 代理人	弁理士 高島 一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 角膜損傷治療剤

(57) 【要約】

【構成】 ラクトフェリンの加水分解物由来のペプチド類、その誘導体、それらの塩類またはそれらの混合物を有効成分として含むことを特徴とする角膜損傷治療剤。

【効果】 本発明の角膜損傷治療剤は、シェーグレン症候群の眼病変、特に乾燥性角結膜炎の進行を有意に抑制し、これを治療することができる。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ラクトフェリンの加水分解物由来のペプチド類、その誘導体、それらの塩類またはそれらの混合物を有効成分として含むことを特徴とする角膜損傷治療剤。

【請求項 2】 角膜損傷治療剤が眼シェーグレン症候群治療剤である請求項 1 記載の角膜損傷治療剤。

【請求項 3】 角膜損傷治療剤が化学腐食性角膜潰瘍治療剤である請求項 1 記載の角膜損傷治療剤。

【請求項 4】 点眼剤の態様である請求項 1～3 のいずれかに記載の角膜損傷治療剤。

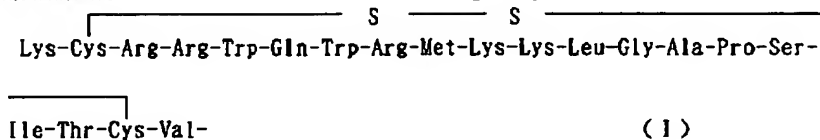
【請求項 5】 眼軟膏剤の態様である請求項 1～3 のいずれかに記載の角膜損傷治療剤。

【請求項 6】 ラクトフェリンの加水分解物由来のペプチド類、その誘導体、それらの塩類またはそれらの混合物を 0.00001～5.0w/v% の割合で含有する請求項 4 に記載の角膜損傷治療剤。

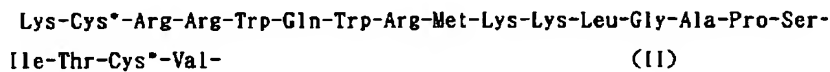
【請求項 7】 ラクトフェリンの加水分解物由来のペプチド類、その誘導体、それらの塩類またはそれらの混合物を 0.00001～5.0w/w% の割合で含有する請求項 5 に記載の角膜損傷治療剤。

【請求項 8】 ラクトフェリンの加水分解物から単離されたペプチドが、次の式 (I) 乃至式 (IX) のいずれかのペプチドである請求項 1、請求項 6 または請求項 7 に記載の角膜損傷治療剤。

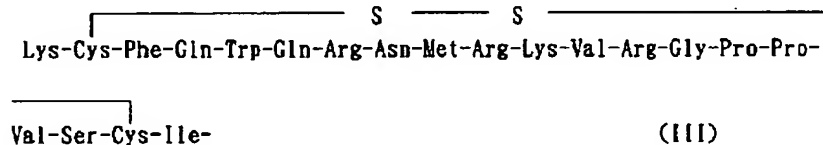
## 【化 1】



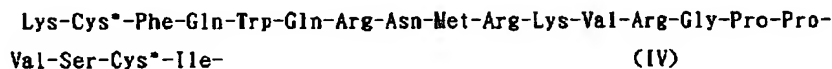
## 【化 2】



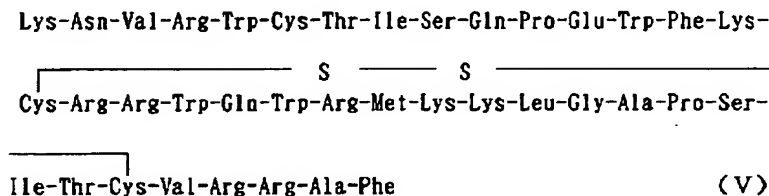
## 【化 3】



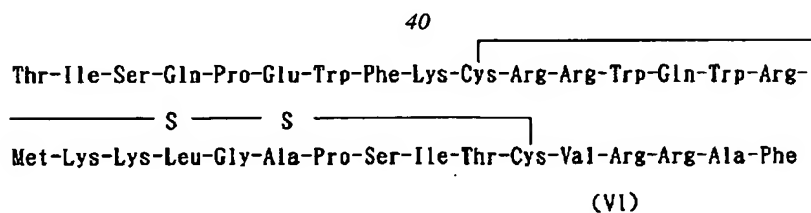
## 【化 4】



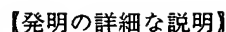
## 【化 5】



## 【化 6】



## 【化 7】



【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】本発明は、ラクトフェリンの加水分解物由来のペプチド類、その誘導体またはそれらの塩類を有効成分として含む角膜損傷治療剤に関する。

【0002】

【従来技術・発明が解決しようとする課題】従来より涙、唾液、乳汁等に含まれている天然の鉄結合性蛋白質であるラクトフェリンに、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌等の有害な微生物に対する抗菌作用があることが知られている〔Journal of Pediatrics：第94巻、第1頁（1979年）〕。更に近年、ヒトやウシのラクトフェリンの加水分解物から、ラクトフェリンの数倍から数十倍もの抗菌活性を有するペプチドがいくつか単離されている（特開平5-92994号公報。以下、該ペプチドと記載することがある。）。該ペプチドは、ヒトを含む哺乳動物の各種疾患の原因となるグラム陽性およびグラム陰性の細菌、酵母等広範囲の微生物に対して、低濃度で公知の抗生物質（例えば、アミノペニシリン等）とほぼ同等の強い抗菌作用を有し、またビフィズス菌等の有益な腸内細菌には作用しないという極めて有用な物質である。しかしながら、従来より該ペプチドの抗菌作用のみが注目されており、該ペプチドが有する他の作用・効果についての報告はほとんどなされていないのが実情である。本発明の目的は、該ペプチド類の新規用途を提供することである。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、該ペプチド類の新規用途を開発すべく種々研究を重ねてきたところ、該ペプチド類が角膜細胞増殖促進作用（より具体的には、例えば角膜上皮細胞増殖促進作用、角膜実質細胞活性化促進作用）を有し、角膜損傷治療剤、例えば眼シェーグレン症候群治療剤（就中、乾燥性角結膜炎）、化学腐食性角膜潰瘍治療剤として有効であるとの新知見を得、これに基づいて本願発明を完成した。

【0004】本発明は、ラクトフェリンの加水分解物由来のペプチド類、その誘導体、それらの塩類またはそれらの混合物（以下、該ペプチド類と記載することがある）を有効成分として含有することを特徴とする角膜損傷治療剤である。

【0005】本明細書において、アミノ酸およびペプチドは、IUPAC-IUB生化学命名委員会で採用された略記法に基づいて、次の略号を用いて表記される。

Ala-: L-アラニン残基

Arg-: L-アルギニン残基

Asn-: L-アスパラギン残基

Asp-: L-アスパラギン酸残基

Cys-: L-システイン残基

Gln-: L-グルタミン残基

Glu: L-グルタミン酸残基

Gly-: L-グリシン残基

His-: L-ヒスチジン残基

11e: L-イソロイシン残基

50 Leu-: L-ロイシン残基

5

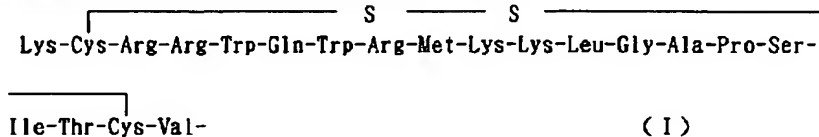
6

Lys-: L-リジン残基  
 Met-: L-メチオニン残基  
 Phe-: L-フェニルアラニン残基  
 Pro-: L-プロリン残基  
 Ser-: L-セリン残基  
 Thr-: L-スレオニン残基  
 Trp-: L-トリプトファン残基  
 Tyr-: L-チロシン残基  
 Val-: L-バリン残基

\*該ペプチド類は、該ペプチド、その誘導体、それらの塩類、それらの混合物等の本発明の目的を達成しえるものであれば特に限定はない。該ペプチドは、公知の化合物であり、公知のラクトフェリンの加水分解物由来のペプチドである。該ペプチドには、例えば、下記式 (I) ~ (IV) に示す少なくとも 20 個、通常 20~47 個、好ましくは 25~38 個、より好ましくは 25 個のアミノ酸残基からなるペプチド類が含まれる。

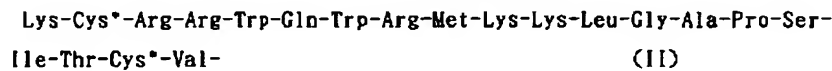
【0007】

【0006】 本発明の角膜損傷治療剤の有効成分である \* 10 【化10】



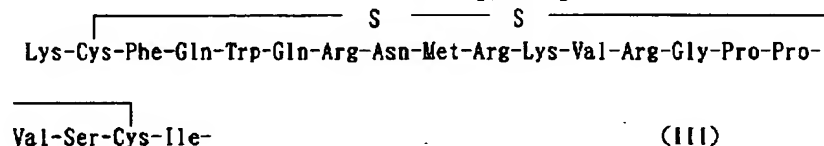
【0008】

【化11】



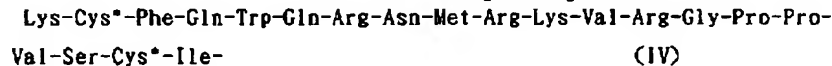
【0009】

20 【化12】



【0010】

【化13】

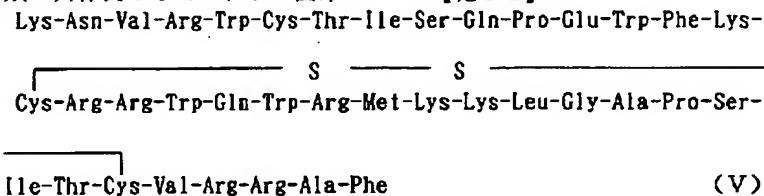


【0011】 (なお、ここで Cys\* はジスルフィド 30 ※のラクトフェリンの加水分解物から単離される下式で示結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾 されるペプチドしたシステインを示す。)

【0013】

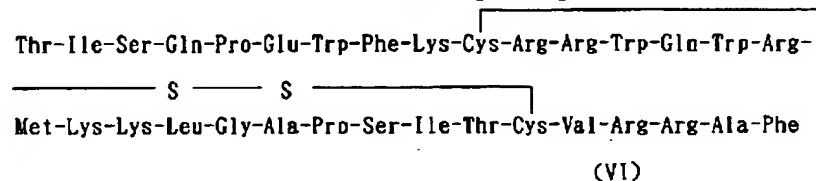
【0012】 該ペプチド類の具体例としては、ウシ由来※

【化14】



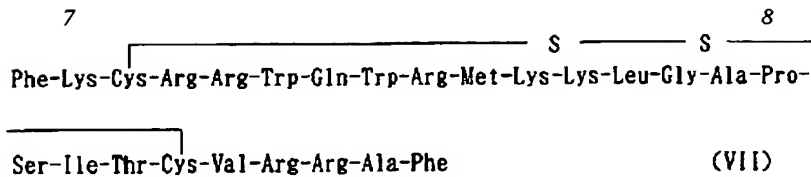
【0014】

40 【化15】

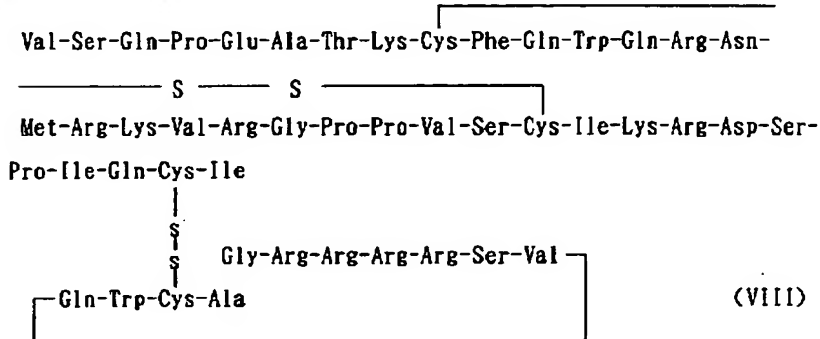


【0015】

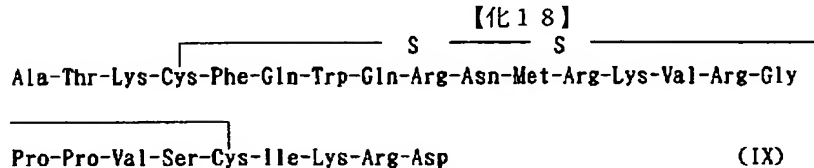
【化16】



【0016】および、ヒト由来のラクトフェリンの加水分解物から単離される下式で示されるペプチド \* 【0017】



【0018】



【0019】が例示される。好ましくは、式 (VII) および式 (IX) で示されるペプチドであり、より好ましくは式 (VIII) で示されるペプチドである。

【0020】誘導体としては、例えばシステイン残基のチオール基が化学的に修飾（例えば、アセトアミドメチル化等）されたペプチドが例示される。塩類としては、薬理学上許容されうる塩であればよく、例えば無機酸（塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等）、有機酸（マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、酢酸、乳酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、パモ酸等）との酸付加塩および第4級塩等が挙げられる。

【0021】本発明で使用される該ペプチド類は、既知の方法によって製造される。例えば、特開平 5-92994 号公報の第9欄第15行～第10欄第18行に記載の方法に従って化学的に合成することもできるし、また、同公報第7欄第22行～第8欄第46行に記載の方法に従って哺乳類のラクトフェリンの加水分解物から単離することができる。誘導体も、各誘導体に応じて自体既知の方法にて製造される。

【0022】本発明の角膜損傷治療剤は、角膜細胞、就中角膜上皮細胞に対して細胞増殖促進作用を有し、さらに角膜実質細胞に対して遊走活性化作用を有するものであり、例えば眼シェーグレン症候群治療剤、化学腐食性角膜潰瘍治療剤として使用される。眼シェーグレン症候群は、涙液等の分泌が減少し、角膜細胞、特に角膜上皮

細胞が破壊され、乾性角結膜炎等の症状を呈する疾病である。該ペプチド類は、角膜上皮細胞増殖促進作用を有し、従って上記眼シェーグレン症候群に有効である。より具体的には涙液の分泌機能不全による涙液分泌減少症、涙液分泌減少に伴って生じる角膜上皮びらん症、それらに伴う各種の症状、例えば眼乾燥感、異物感、羞明、灼熱感、結膜の充血、糸状角膜炎、粘稠性ある目脂等の症状の改善に効果がある。また、該ペプチド類は、角膜実質の繊維芽細胞の活性化を促進することによる化学腐食性角膜潰瘍に対する治療促進効果があり、化学腐食性角膜潰瘍治療剤としても有用である。化学腐食としては、アルカリ腐食が代表的なものとして挙げられる。

【0023】本発明の角膜損傷治療剤は、通常該ペプチド類自体、またはこれと公知の薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、希釈剤等と混合し、公知の方法に従って、点眼剤、眼軟膏剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、注射剤等の形態に製剤化されて経口的または非経口的に投与することができる。特に、点眼剤または眼軟膏剤の剤形とすることが好ましい。

【0024】点眼剤の態様の角膜損傷治療剤としては、水溶液剤が例示される。点眼剤の pH は該ペプチド類が安定で眼粘膜への刺激性が少ない pH、例えば pH 約 3～8、好ましくは pH 約 4～6 の範囲に調整される。該ペプチド類の含有量は適応疾患等に応じて適宜変更することができるが、点眼剤全体に対して通常 0.00001～5.0w/v%、好ましくは 0.0001～1w/v%

v %である。

【0025】点眼剤には、さらに通常点眼剤に配合される緩衝剤、等張化剤、保存剤、増粘剤、安定化剤、抗酸化剤、pH調整剤、キレート剤、吸収促進剤等の各種の添加剤を適宜配合することができる。

【0026】緩衝剤としては、pH 4～6に緩衝能を有する緩衝剤を使用することができる。例えば、ホウ酸塩緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、酒石酸塩緩衝剤、リン酸塩緩衝剤（リン酸二水素一ナトリウム、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素一カリウム、リン酸一水素二カリウム等）、酢酸ナトリウム等の酢酸塩緩衝剤およびε-アミノカプロン酸、グルタミン酸ナトリウム等のアミノ酸塩等が挙げられる。緩衝剤の含有割合は、点眼剤中に通常0.05～0.5w/v %である。

【0027】等張化剤としては、点眼剤として通常使用されるブドウ糖、マンニトール、ソルビトール等の糖類、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等の多価アルコール類、塩化ナトリウム等の塩類等が用いられる。等張化剤は、点眼剤の浸透圧が涙液と等張になる量で添加すればよい。

【0028】保存剤としては、抗菌作用および抗黴作用を有する無毒性、無刺激性である眼に適用可能な化合物が挙げられる。例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等の第4級アンモニウム塩；グルコン酸クロルヘキシジン等の陽イオン性化合物；パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル等のパラオキシ安息香酸エステル類；デヒドロ酢酸ナトリウム；チメロサル等が挙げられる。

【0029】増粘剤としては、例えばヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸およびそれらの塩等が用いられる。溶解補助剤（安定化剤）としては、例えばシクロデキストリン類、ポリビニルピロリドン等の水溶性高分子、ポリソルベート80等の界面活性剤、メチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース等の水溶性高分子等が用いられる。

【0030】抗酸化剤としては、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、トコフェロール、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等が挙げられる。キレート剤としては、エデト酸ナトリウム（エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム）、クエン酸ナトリウム等が例示される。pH調整剤としては、塩酸、クエン酸、リン酸、酢酸、酒石酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等が挙げられる。

【0031】点眼剤は、公知の水溶液剤の製法に従い、医薬上許容される溶媒（例：滅菌精製水、滅菌緩衝液等の水性溶媒）に該ペプチド類を溶解させることにより調

製される。例えば、溶媒に必要な応じて上記した緩衝剤、等張化剤、保存剤等の添加剤を添加し、pH調整剤（塩酸、水酸化ナトリウム溶液等）を用いてpH調整後、該ペプチド類を溶解させて均質な水溶液剤を得る。以上の点眼剤の調製は、無菌操作法により行うか、あるいは適当な段階で滅菌処理を施すことにより行われる。

【0032】眼軟膏剤の態様の角膜損傷治療剤は、通常用いられる眼用軟膏基剤中に該ペプチド類を混和し、常法に従って製剤化することによって調製することができる。該ペプチド類の含有量は適応疾患等に応じて適宜変更することができるが、眼軟膏剤全体に対して通常0.00001～5.0w/w %、好ましくは0.0001～1w/w %である。

【0033】眼軟膏剤用の基剤としては、ワセリン、プラスチックベース、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースが好ましい。また、軟膏剤においても、必要に応じて前記の例えば保存剤等の添加剤を配合させることができる。

【0034】さらに、本発明の角膜損傷治療剤には、本発明の目的に反しない限り、別種の薬効を奏する成分を適宜含有させることもできる。

【0035】眼シェーグレン症候群治療のための本発明製剤の投与量は、患者の年齢、体重、症状、治療剤の剤型等によっても異なるが、例えば成人患者に点眼剤として用いる場合は、有効成分である該ペプチド類を約0.00001～5.0w/v %、好ましくは約0.0001～1w/v %程度含有する点眼剤として、症状に応じて1回量1～数滴を1日1～4回投与することが好ましい。眼軟膏剤の場合は、有効成分である該ペプチド類を約0.00001～5.0w/w %、好ましくは約0.0001～1w/w %程度含有する眼軟膏剤として、症状に応じて1日2～5回程度投与することが好ましい。

【0036】角膜損傷治療のための本発明製剤の投与量は、患者の年齢、体重、症状、治療剤の剤型等によっても異なるが、例えば成人患者に点眼剤として用いる場合は、有効成分である該ペプチド類を約0.00001～5.0w/v %、好ましくは約0.0001～1w/v %程度含有する点眼剤として、症状に応じて1回量1～数滴を1日1～4回投与することが好ましい。眼軟膏剤の場合は、有効成分である該ペプチド類を約0.00001～5.0w/w %、好ましくは約0.0001～1w/w %程度含有する眼軟膏剤として、症状に応じて1日2～5回程度投与することが好ましい。該ペプチド類は、ヒトの初乳や通常摂取している牛乳等に由来する天然のペプチドであることから極めて安全性の高いものであり、例えば式(VII)のペプチドの場合、特開平6-172200号公報の試験例2に記載されているとおりID<sub>50</sub>は2000mg/kg体重以上である。

【0037】

【実施例】以下、実施例をもって本発明をより詳細に説

## 11

明し、試験例によって本発明の効果を明らかにするが、これらは単なる例示であって、これらによって本発明の範囲が限定されるものではない。

## 【0038】実施例1

常法により、次の処方で点眼剤を調製した。

処方1 点眼剤(100ml中), pH5.0

式(VII)のペプチド 1g  
塩化ナトリウム 0.9g  
酢酸ナトリウム 0.1g  
酢酸 適量  
滅菌精製水 適量

## 【0039】実施例2

常法により、次の処方で点眼剤を調製した。

処方2 点眼剤(100ml中), pH4.0

式(IX)のペプチド 0.1g  
塩化ナトリウム 0.9g  
ε-アミノカプロン酸 0.1g  
滅菌精製水 適量

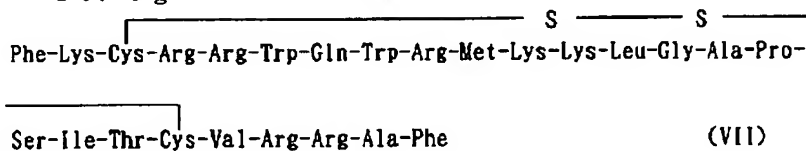
## 【0040】実施例3

常法により、次の処方で眼軟膏剤を調製した。

処方3 眼軟膏剤(100g中)

式(I)のペプチド 0.5g  
流動パラフィン 10.0g

\*



## 【0046】②試験動物

6週齢の雄性MRL/1マウスを用いた。5週齢のマウスを1週間予備飼育して、角膜等に異常のないことを確認し使用した。飼育条件は室温：23±2℃、湿度：55±10%に設定した飼育室内で、固形飼料(放射線滅菌飼料MRストック、日本農産工業)および水道水を自由摂取させた。

## ③試験方法

マウスが6週齢になった時点で、右眼に0.2%該ペプチド点眼剤を点眼した。

## 採点評価基準

症 状	採 点
症状が認められない	0
角膜に点状の混濁が認められる(瞳孔透過可)	0.5
角膜上皮に軽度の混濁が1/3以下認められる(瞳孔透過可)	1
角膜上皮に地図状混濁が1/2以上認められる(瞳孔透過可)	2
角膜上皮に地図状混濁が認められる(瞳孔透過不可)	3

尚、各評価の中間と考えられる症状は0.5点間隔で評価した。

## 【0048】④試験結果および考察

シェーグレン症候群マウスの角膜上皮の経時的観察結果を表1に示した。点眼開始1か月後に对照群に僅かな点状の混濁症状が現れ、2か月後には角膜中央部に軽度の地図状混濁が認められ始めた。3か月後には角膜上皮の

## 12

\*白色ワセリン

適量

## 【0041】実施例4

常法により、次の処方で注射剤を調製した。

処方4 注射剤(100ml中), pH6.0

式(IV)のペプチド 0.01g  
マンニトール 5.0g  
水酸化ナトリウム 適量  
注射用水 適量

## 【0042】

10 【試験例】以下に、本発明の角膜損傷治療剤の有効性を示す薬理試験およびその結果を示す。

## 【0043】試験例1

眼シェーグレン症候群モデルマウスであるMRL/1マウスを用いて、該ペプチドの乾燥性角膜病変に対する効果を検討した。

## 【0044】①試験物質

該ペプチドを生理食塩液に溶解して0.2%濃度に調製し、被験薬とした。なお、調製は1週間に1回行った。該ペプチドとしては、下式で示されるウシ由来のものを使用した。

## 【0045】

## 【化19】

※チドあるいは生理食塩液を1日4回、1回5μl点眼し(以下、本試験例においてそれぞれ該ペプチド群、对照群という)、スリットランプを用いて角膜上皮を点眼開始から1か月間隔で観察し、以下に示す基準に従って採点評価した。点眼開始3、5および7か月後には一部のマウスを屠殺し、角膜、副涙腺、舌下腺および顎下腺の組織標本を作成し、H.E-PAS重複染色を行い顕微鏡観察を行った。

## 【0047】

混濁領域は広がり、更にフルオレセインによる角膜染色において、点状の染色斑が認められ、その後も同様の染色斑が認められた。3か月後の病理学的評価では角膜上皮の表層の剥離が認められ、副涙腺では粘性分泌物による涙管の閉塞が認められた。5か月後においても同様の



13

症状が認められた。また、シェーグレン症候群の症状である舌下腺および顎下腺での腺細胞の空胞および副涙腺での粘性分泌物による涙管の閉塞が認められた。これに対して、該ペプチド群では5か月後までのスリットランプによる観察では角膜上皮の混濁は軽度であり、有意な角膜上皮混濁抑制効果が認められた。また、病理学的評\*

MRL/1 マウスの眼球乾燥症に対する0.2%該ペプチド類の効果

経過月数	対 照 群	該ペプチド群
1	1.0 ± 0.8 (n=25)	0.8 ± 0.4 (n=25)
2	1.7 ± 0.4 (n=25)	1.3 ± 0.6* (n=25)
3	2.4 ± 0.4 (n=25)	1.8 ± 0.8* (n=19)
4	2.4 ± 0.4 (n=19)	1.7 ± 0.8* (n=18)
5	2.8 ± 0.6 (n=14)	1.8 ± 0.9* (n=10)
6	2.5 ± 0.8 (n= 6)	1.9 ± 0.7 (n=10)

対照群との有意差：\*：P < 0.01

#### 【0050】試験例2

該ペプチドの角膜実質細胞活性化促進作用に起因する角膜障害治療効果を調べた。

#### 【0051】①試験物質

試験例1で使用したのと同じペプチドを生理食塩液で溶解し、1.0%および0.5%濃度に調製し、被験薬とした。

#### ②試験動物

試験動物として体重2kgの雄性白色家兎を用いた。これらの家兎は入荷日に受入れ検査を行い、異常のないことを確かめた後、室温を23±3℃、湿度を55±10%に設定した飼育室内で一匹ずつ飼育し、固形飼料（ラボRストック、日本農産工業）を1日80g与え、水道※

20※水を自動供水にて自由摂取させた。

#### ③試験方法

家兎の角膜の中央部に1N NaOHをしみこませた直径6mmの濾紙を1分間接触させアルカリ腐食を起こさせた。アルカリ腐食を起こした後、直ちに0.5%、1.0%の該ペプチドあるいは生理食塩液を1日8回、1回あたり50μlずつ、右眼に点眼し、左眼は無処置とした。観察は以下の項目に従って1、3および5日目に行った。6日目には眼球を摘出して常法に従って固定・包埋・薄切した後、角膜をトルイジンブルーおよびヘマトキシリンエオジンで染色し、潰瘍辺縁部の繊維芽細胞（fibroblast cell）の遊走を評価した。

#### 【0052】

観察項目	採点
角膜潰瘍なし	0
角膜上皮側より内皮側へ 1/3未満の角膜潰瘍混濁の深度	1
角膜上皮側より内皮側へ 1/3～2/3 の角膜潰瘍混濁の深度	2
角膜上皮側より内皮側の 2/3以上の角膜潰瘍混濁の深度	3

#### 【0053】④試験結果および考察

アルカリ潰瘍を起こさせた家兎角膜上皮の観察結果を表2に、病理評価を表3に示した。スリットランプによる観察では、3日目では角膜混濁の程度に各群間に差は認められなかった。5日目では、生理食塩液点眼では角膜上皮の修復を認め、角膜混濁の進行は認められなかった。これに対して該ペプチド群では角膜混濁の進行抑制と混濁面積の縮小が認められた。角膜の病理評価では生

理食塩液点眼に比較して、該ペプチドの点眼によって実質細胞の活性化および角膜実質の繊維芽細胞の遊走の促進が認められた。以上のことより、該ペプチドにおいて、角膜実質の繊維芽細胞の活性化を促進することにより、化学腐食による角膜潰瘍の治癒促進効果を発揮することが明らかになった。

#### 【0054】

#### 【表2】

被験群	処理経過日数	
	3日後	5日後
1.0% 該ペプチド (n=4)	1.5±0.48	0.9±0.48*
0.5% 該ペプチド (n=4)	1.6±0.25	1.4±0.48
生理食塩液 (n=4)	2.1±0.25	1.9±0.48

対照群との有意差; \* : P < 0.05

【0055】

【表3】

該ペプチド類で処理したアルカリ潰瘍角膜実質の繊維芽細胞の遊走の程度

被験群	程 度			
	-	+	++	+++
1.0% 該ペプチド* (n=4)		1	5	1
0.5% 該ペプチド (n=4)	1	2	1	
生理食塩液 (n=4)	2	4	1	

対照群との有意差; \* : P < 0.05

程度; - : なし, + : 僅かにあり, ++ : 中程度, +++ : 非常にあり

【0056】試験例3

該ペプチド類の培養角膜上皮細胞の増殖効果を調べた。

①試験方法: 96穴プレートにヒト角膜上皮細胞を1穴あたり20% confluentになるよう播種し、10%ウシ胎児血清を含むDMEM/HamF12 1:1 等比混合培養液で24時間前培養後、0.0001%、0.0003%、0.001%、0.003%、0.01%、0.03%、0.1%、0.3%、0.5%の各濃度の該ペプチドを含む培養液（培養液はいずれもウシ胎児血清不含のDMEM/HamF12 1:1 等比混合培養液）に交換し、3日間培養した。培養後、Neutralredの取込みを測定することにより生細胞数を測定し、細胞増殖に対する該ペプチド類の影響を検討した。該ペプチドとしては、試験例1と同じものを使用した。

②試験結果:

【0057】

【表4】

該ペプチド濃度 (%)	細胞増殖率 (%)
0.01	158
0.003	186
0.001	159
0.0003	165
0.0001	120
0	100

【0058】該ペプチドは角膜上皮細胞の増殖を促進した。

40 【0059】

【発明の効果】本発明の角膜損傷治療剤は、例えば角膜上皮細胞増殖促進作用を有し、シェーグレン症候群の眼病変である乾燥性角結膜炎の治療に効果があり、涙液の分泌減少に伴って生じる各種の症状、例えば眼乾燥感、異物感、羞明、灼熱感、結膜の充血、糸状角膜炎等の症状および角膜上皮びらん症を有効に改善することができる。また、本発明の角膜損傷治療剤は、例えば角膜実質細胞活性化促進作用を有し、化学腐食性角膜潰瘍治療剤として有用である。

## 【手続補正書】

【提出日】平成6年8月24日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0036】角膜損傷治療のための本発明製剤の投与量は、患者の年齢、体重、症状、治療剤の剤型等によっても異なるが、例えば成人患者に点眼剤として用いる場合は、有効成分である該ペプチド類を約0.00001～5.0w/v%、好ましくは約0.0001～1w/v

%程度含有する点眼剤として、症状に応じて1回量1～数滴を1日1～4回投与することが好ましい。眼軟膏剤の場合は、有効成分である該ペプチド類を約0.00001～5.0w/w%、好ましくは約0.0001～1w/w%程度含有する眼軟膏剤として、症状に応じて1日2～5回程度投与することが好ましい。該ペプチド類は、ヒトの初乳や通常摂取している牛乳等に由来する天然のペプチドであることから極めて安全性の高いものであり、例えば式(VII)のペプチドの場合、特開平6-172200号公報の試験例2に記載されているとおりLD<sub>50</sub>は2000mg/kg体重以上である。

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

// A61K 38/16

(72) 発明者 横柿 修一

兵庫県神戸市西区南別府4丁目366番地の

1 302号